

STABILIZED IMMOBILIZING ANTIBODY

Patent number: JP61189454
Publication date: 1986-08-23
Inventor: KATSUKI SHOJI; MUTO SEITARO; KITABORI FUJIKO
Applicant: FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO
Classification:
- **international:** A61K39/00; C07K17/00; G01N33/543
- **european:** G01N33/531; G01N33/543
Application number: JP19850031138 19850218
Priority number(s): JP19850031138 19850218

Abstract of JP61189454

PURPOSE:To obtain a dried immobilizing antibody which maintains the initial enzyme activity without deterioration even after the long-term preservation at a room temp. and is convenient for transportation, preservation, etc. by treating the immobilizing antibody with an aq. soln. contg. cane sugar or mannitol or a mixture composed thereof as a protective agent then drying the same thereby forming the antibody. **CONSTITUTION:**The immobilizing antibody is repeatedly subjected to the operation of bringing the immobilizing antibody into contact with the aq. soln. contg. the cane sugar or mannitol or the mixture composed thereof as the protective agent (the soln. contg a buffer soln. such as phosphoric acid-buffered physiological salt soln. as a solvent) and is then dried. The dried immobilizing antibody which maintains the initial enzyme activity without deterioration even after the long-term preservation at a room temp. and is convenient for transportation, preservation, etc. is thus obtd.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-189454

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)8月23日

G 01 N 33/543

A 61 K 39/00

// C 07 K 17/00

A-7906-2G

8214-4C

6464-4H

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 安定化された固定化抗体

⑮ 特 願 昭60-31138

⑯ 出 願 昭60(1985)2月18日

⑰ 発 明 者 勝 木 昭 次 大阪府豊能郡豊能町光風台3-12-12

⑰ 発 明 者 武 藤 誠 太 郎 吹田市山田西2-16-5-301

⑰ 発 明 者 北 堀 不 二 子 川西市向陽台3-6-190

⑱ 出 願 人 藤沢薬品工業株式会社 大阪市東区道修町4丁目3番地

⑲ 代 理 人 弁理士 青 木 高

明 細 書

1. 発明の名称

安定化された固定化抗体

2. 特許請求の範囲

免疫化学的測定に用いる抗体を固相担体に結合させ不溶化した固定化担体において、該固定化抗体をショ糖もしくはマンニトールまたはそれらの混合物を保護剤として含有する水溶液で処理した後、乾燥してなることを特徴とする安定化された固定化抗体。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

この発明は、安定化された固定化抗体に関する。さらに詳細には、免疫化学的測定に使用される固定化抗体において、免疫活性を損なうことなく長期保存できる安定化された固定化抗体に関し、疾病の診断等の医療の分野で利用される。

従来技術

近年、生体内の微量物質(例えば、ホルモン、癌関連物質等)の定量法として、酵素免疫測定法(以下、「EIA」という)、ラジオイムノアッセイなどが広く用いられ、すでに測定キットが実用に供されている。これらの測定法の内EIAの一例を具体的に示すと、固相に結合させた抗体(以下「固定化抗体」という)と酵素標識した抗体(以下「酵素標識抗体」という)とで測定対象物質(抗原)をサンドイッチ状に固定化し、固定化された状態の測定対象物質を反応系から分離する。そして、結合した測定対象物質量の定量は、酵素標識抗体の酵素と基質との反応によって生成する物質の量を測定することにより行なわれる。従って、EIAキットの実用化にあたっては、固定化抗体の免疫活性を長期間安定に保持することが重要な課題であり、このことは、EIAに限らず、ラジオイムノアッセイなどにおいても同様である。

この固定化抗体は、輸送および保存等の容易性から乾燥された状態で提供されるのが好まし

いが、多くの固定化抗体は乾燥過程で免疫活性が著しく低下し、その上乾燥状態で保存すると免疫活性がさらに低下する。そのため、長期間にわたる保存にさいしては、通常、固定化抗体は、適当な安定剤を含む緩衝液中に保存することが必要であり、取扱いが不便であった。

他方、乾燥した固定化抗体を安定化する方法としては、特開昭58-123459号公報記載の方法が知られているが、長期間保存する場合、特に室温で保存する場合には十分な効果を期待できなかった。

発明が解決しようとする問題点

この発明は、低温というまでもなく室温で長期間保存しても免疫活性が低下せず、かつ輸送・保存等に簡便な乾燥した固定化抗体を提供するものである。

発明の構成

この発明は、免疫化学的測定に用いる抗体を固相担体に結合させ不溶化した固定化抗体において、該固定化抗体をショ糖もしくはマンニト

ロテイン(以下「AFP」いう)、プロテインC、フェリチン、癌胎児性抗原、 β_2 -ミクログロブリン、フィブリン分解産物などが挙げられる。

固相担体に固定化される抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が包含され、これらの抗体は慣用の方法で産生される。

この発明に使用される保護剤としては、ショ糖もしくはマンニトールまたはこれらの混合物が用いられ、ショ糖が特に好ましい。これらの保護剤は、水性溶媒に溶解して用いられるが、水性溶媒としては、通常、リン酸緩衝化生理食塩水などの緩衝液が用いられ、中でも牛血清または/および牛血清アルブミン(以下「BSA」という)を含有する緩衝液が特に好ましい。

水溶液中の保護剤の濃度は、保護剤の種類、固定化抗体を保存する条件などにより異なるが、通常0.1~15%(重量、以下同じ)、好ましくは0.25~10%、さらに好ましくは0.5~5%の範囲から適宜選択される。

ールまたはそれらの混合物を保護剤として含有する水溶液で処理した後、乾燥してなることを特徴とする安定化された固定化抗体に関するものである。

この発明に使用される固相担体は、特に、限定されず、免疫化学的測定に利用できるすべての固相担体を使用できるが、好ましくはプラスチック、ガラスまたは紙を用いてディスク状、ビーズ状またはチューブ状に形成されたものがよく、プラスチック製マイクロプレートが最も好ましい。

固相担体と抗体の結合は、物理的または化学的手法により行なわれ、通常は吸着により行うのが便利である。

この発明における測定対象物質は、特に限定されず、何らかの方法で抗体が得られるものであれば対象となり得る。

それら測定対象物質としては、例えばインスリン、各種免疫グロブリン、各種インターフェロン(以下「IFN」という)、 α -フェトプ

固定化抗体の保護処理は、固定化抗体と上記保護剤含有水溶液との接触により行なわれる。

処理時間は特に限定されないが、通常、2分間で十分である。また、2回以上接触操作をくり返し行なってもよい。

保護剤含有水溶液で処理した後の固定化抗体の乾燥は、自然乾燥、通気乾燥または減圧乾燥のいずれでもよい。乾燥温度は、免疫活性の低下を防止するため、常温以下、例えば、2~10℃程度の温度で行なうのが特に好ましい。

以下、この発明を実施例および試験例により説明する。

実施例

以下の実施例において、使用した各抗体は次の通りである。

- i) 抗ブタインスリンポリクローナル抗体:
ブタインスリン(シグマ社製)を抗原としてモルモットから得られたポリクローナル抗体
- ii) 抗ヒトAFPモノクローナル抗体:

藤沢薬品工業(株)製、製品番号FLA
-10

111) 抗ヒトIFN- α モノクローナル抗体:

藤沢薬品工業(株)製、製品番号
FLA-06

実施例1

抗ブタインスリンポリクローナル抗体を50 mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6、以下「緩衝液1」という)で10 μ g/mlに希釈し、その溶液をマイクロプレートのウェルに200 μ l加えた。室温で1時間放置後、抗体溶液を吸引除去した。0.1%BSA含有リン酸緩衝液(10 mM)生理食塩水(pH7.2、以下「緩衝液2」という)にショ糖を所定濃度に溶解した溶液をウェルに満たし、吸引除去する操作を2回行なう。さらに、上記ショ糖溶液をウェルに満たした1時間放置した後、吸引除去する。

その後、清浄な紙の上で、ウェル開口部を下に向け、水きりを行なった後、室温で2時間減

した溶液をウェルに満たし、以下実施例1と同様に処理し、マンニトールで安定化された固定化抗ブタインスリン抗体を得た。

試験例

上記の各実施例で得られた固定化抗体の安定性試験をEIAにより行なった。使用した試薬、試験方法、試験結果は次の通りである。

1) 試薬

a) 酵素標識抗体の作成

ナカネラ[ザ ジャーナル オブ ヒストケミストリー アンド サイトケミストリー(The Journal of Histochemistry and Cytochemistry)、第22巻、1084頁 1974年]、ヨシタケラ[ザ ジャーナル オブ バイオケミストリー(The Journal of Biochemistry)、第92巻 1413~1424頁 1982年]

圧乾燥して、ショ糖で安定化された固定化抗ブタインスリン抗体を得た。

実施例2

抗ヒトAFPモノクローナル抗体を緩衝液1で5 μ g/mlに希釈し、その溶液をマイクロプレートのウェルに300 μ l加えた。以下、実施例1と同様に処理して、ショ糖で安定化された固定化抗ヒトAFP抗体を得た。

実施例3

抗ヒトIFN- α モノクローナル抗体を緩衝液1で5 μ g/mlに希釈し、マイクロプレートのウェルに300 μ l加えた。以下、実施例1と同様に処理して、ショ糖で安定化された固定化抗ヒトIFN- α 抗体を得た。

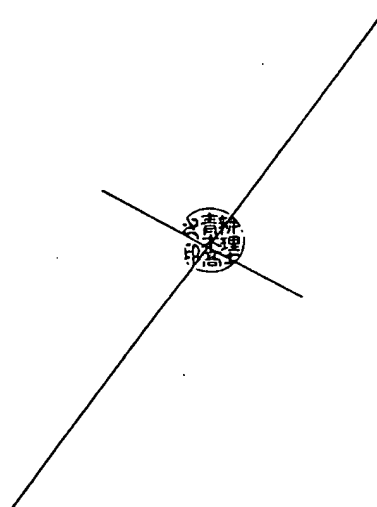
実施例4

抗ブタインスリンポリクローナル抗体を緩衝液1で10 μ g/mlに希釈し、その溶液をマイクロプレートのウェルに200 μ l加えた。

室温で1時間放置後、抗体溶液を吸引除去した。マンニトールを緩衝液2に所定濃度溶解

などの方法に従って、抗体またはそのFab'にパーオキシダーゼ(シグマ社製、以下「POD」という)を結合させた酵素標識抗体を作成した。

各抗原について、使用した抗体および作成した酵素標識抗体は次の通りである。



抗原	酵素標識抗体
ブタインスリン	実施例で用いた抗ブタインスリンポリクローナル抗体のF a b' に P O D を結合させた。
ヒトAFP	抗ヒトAFPモノクローナル抗体（藤沢薬品工業（株）製、製品番号FLA-11）に P O D を結合させた。
ヒトIFN- α	抗ヒトIFN- α モノクローナル抗体（藤沢薬品工業（株）製、製品番号FLA-03）のF a b' に P O D を結合させた。

間放置した後、反応液を等時間間隔で吸引除去した。0.1% BSAおよび0.05% ツイン-20を含有するリン酸緩衝化生理食塩水（pH 7.2）をウェルに満たし、吸引除去する洗浄操作を3回行った。発色液200 μ lをウェルに加え室温で30分間放置した後、1 M硫酸（100 μ l）で酵素反応を停止させ、490 nmの吸光度をミニリーダーMR590（ダイナテック社製）で測定した。

上記操作中、使用した酵素標識抗体溶液量等は次の通りである。

b) 基質溶液

0.1 Mクエン酸-リン酸緩衝液（pH 5.0）に0-フェニレンジアミン2塩酸塩（2.5 mg / ml）および過酸化水素（0.018 %）を溶解した溶液（以下「発色液」という）を使用した。

2) 試験方法

a) 保存方法

実施例1～4で作成したマイクロプレートのウェルをシールした後、室温および10 $^{\circ}$ Cの恒温室に放置した。

b) 免疫活性測定法

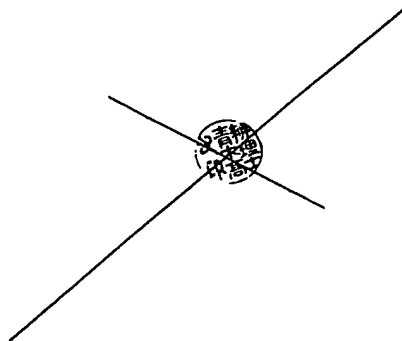
マイクロプレートのウェルに、5%牛血清、0.1% BSAおよび0.05% ツイン-20を含有するリン酸緩衝化生理食塩水に酵素標識抗体を溶解した溶液を所定量に加え、ついで所定濃度の抗原溶液を所定量等時間間隔で加えた。室温で所定時

抗原	酵素標識抗体溶液量 (μ l)	抗原溶液量 (μ l) (抗原溶液 濃度)	抗原抗体 反応時間 (hr)
ブタイン スリン	100	20 (278 μ u/ml)	2
AFP	200	20 (100 ng/ml)	1
IFN- α	100	100 (100 Iu/ml)	3

3) 試験結果

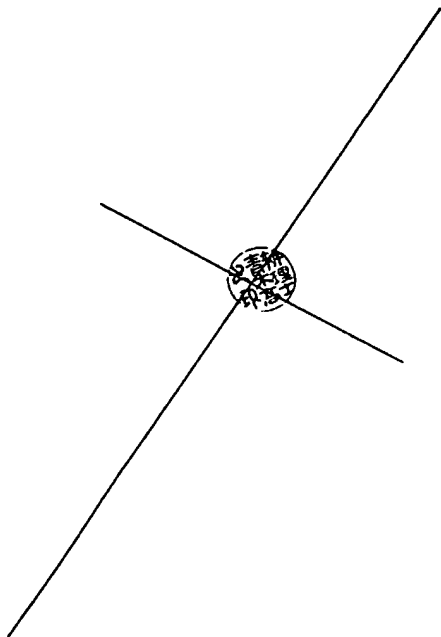
固定化抗体の抗体活性は次式を用いて算出した。

$$\text{抗体活性(\%)} = \frac{\text{被検プレートの吸光度}}{\text{作成直後のプレートの吸光度}} \times 100$$



尚、保護剤を含まない緩衝液2を用いて、実施例1～4と同様にして作成したプレートを対照とした。

実施例1～4の固定化抗体について、室温および10℃における安定性の試験結果を第1表および第2表に示した。



第 1 表

プレート	保存 条件	保護剤溶液 濃度 (%)	抗体活性(%)				
			保存日数(週)				
			1	2	3	4	5
実施例 1 の プレート	室温	対照	100	13.4	—		
	(乾燥)	2 . 0	93.3	97.0	88.1	99.3	84.4
		5 . 0	90.5	99.3	89.1	96.4	88.4
実施例 2 の プレート	室温	対照	106.2	74.3	67.3	23.9	—
	(乾燥)	0 . 5	116.5	109.7	128.5	120.4	126.2
		1 . 0	100.0	108.3	110.0	88.3	75.8
		2 . 0	100.0	110.3	133.6	128.0	115.0
実施例 3 の プレート	室温						
	(乾燥)	対照	35.0	10.5	—		
		2 . 0	97.4	95.3	98.5	92.0	98.2
		5 . 0	100.9	100.3	100.6	95.4	100.9